

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 689 519

(21) N° d'enregistrement national :

92 04322

(51) Int Cl⁵ : C 12 N 5/06, G 01 N 33/536

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 03.04.92.

(71) Demandeur(s) : Société Anonyme dite: BIO MERIEUX — FR.

(30) Priorité :

(72) Inventeur(s) : Perron André et Seigneurin Jean-Marie.

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : 08.10.93 Bulletin 93/40.

(73) Titulaire(s) :

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche : Le rapport de recherche n'a pas été établi à la date de publication de la demande.

(74) Mandataire : Cabinet Germain et Maureau.

(54) Procédé de culture in vitro de cellules infectées par un virus associé à la sclérose en plaques et lignées cellulaires obtenues.

(57) La présente invention a pour objet un procédé pour la culture in vitro de cellules primaires infectées par un virus associé à la sclérose en plaques, et les lignées cellulaires infectées ainsi obtenues.

Selon l'invention, le procédé consiste à effectuer une culture de cellules permisives au virus, lesdites cellules étant choisies parmi les cellules de plexus choroïdes humains non infectées et des cellules de Schwannome humains non infectées, dans un milieu de culture approprié, comprenant au moins les constituants nécessaires à la croissance desdites cellules permisives et un anticorps polyclonal anti-interféron bêta; puis à mettre en contact lesdites cellules ainsi cultivées avec des cellules primaires infectées par le virus dans des conditions déterminées permettant la propagation du virus des cellules primaires infectées aux cellules cultivées, sa réplication et son expression.

L'invention trouve notamment application dans le domaine de l'industrie du diagnostic et de l'industrie pharmaceutique.

FR 2 689 519 - A1



**Procédé de culture in vitro de cellules infectées
par un virus associé à la sclérose en plaques
et lignées cellulaires obtenues**

La présente invention a pour objet un procédé pour
5 la culture in vitro de cellules primaires infectées par un
virus associé à la sclérose en plaques et les lignées
cellulaires infectées ainsi obtenues.

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie
démyélinisante du système nerveux central (SNC) que l'on
10 suspecte depuis plusieurs années être associée à un virus,
bien que l'agent causal n'ait pas encore été déterminé
avec certitude.

De nombreux travaux ont étayé cette hypothèse
d'une étiologie virale de la maladie, mais aucun des virus
15 connus testés ne s'est avéré être l'agent causal
recherché.

Par la suite, l'observation chez des patients
atteints de sclérose en plaques de phénomènes assimilables
à une réaction d'auto-immunité a conduit à une hypothèse
20 étiologique auto-immune "essentielle" (Lisak R.P., Zweiman
B. New Engl. J. Med. 1977; 297, 850-853, et Lassmann H. et
Wisniewski H.M. Arch. Neurol. 1979; 36, 490-497).
Cependant, cette auto-immunité dirigée contre certains
composants du système nerveux central s'est révélée peu
25 spécifique de la SEP et fréquente dans des inflammations
du SNC, associées ou non à une infection, comme cela a été
montré par Hirayama M. et al. (Neurology 1986 ; 36, 276-8)
Kenneth G. Warren et al. (Annals of Neurology 1986 ; 20,
20-25), Suzumura A. et al. (Journal of Neuroimmunology
30 1986 ; 11, 137-47) et Tourtelotte W. et al. (Journal of
Neurochemistry 1986 ; 46, 1086-93). De plus, comme l'a fait
remarquer E.J. Field (The Lancet 1989 ; 1, 1272), aucune
des thérapeutiques immunsuppressives n'a permis d'obtenir
des résultats décisifs contre la SEP.

35 Une hypothèse a été émise selon laquelle un
rétrrovirus serait à l'origine de la maladie. La découverte

de A. Gessain et al. (J. Infect. Disease 1988 ; 1226-1234), de syndromes neurologiques associés au virus HTLV-1, connu à l'origine comme agent de leucémies T de l'adulte, a conduit de nombreux auteurs tels que H. 5 Koprowski et al. (Nature 1985 ; 318, 154), M. Ohta et al. (J. Immunol. 1986 ; 137, 3440), E.P. Reddy et al. (Science 1989 ; 243, 529), S.J. Greenberg et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989 ; 86, 2878), J.H. Richardson et al. (Science 1989 ; 246, 821), S.L. Hauser et al. (Nature 1986 ; 322, 10 176) et A. Karpas et al. (Nature 1986 ; 322, 177), à rechercher une implication de ce rétrovirus humain dans la SEP, cependant sans succès ou avec des résultats évoquant des réactions croisées.

Il existe par ailleurs un modèle animal très proche de la SEP, induit par un rétrovirus : le virus MAEDI-VISNA du mouton. Il est connu que l'infection naturelle par ce virus concorde avec la plupart des données cliniques et épidémiologiques de la SEP, comme le rapportent Johnson R.T. (Rev. Infect. Dis. 1985 ; 7, 66-67), Narayan O. et Cork L.C. (Rev. Infect. Dis. 1985 ; 7, 89-98) et Nathanson N. et al. (Rev. Infect. Dis. 1985 ; 7, 75-82). L'infection expérimentale des moutons par inoculation intra-ventriculaire de souches neurovirulentes du virus VISNA a permis d'établir la responsabilité de ce 15 virus dans la génèse de cette affection démyélinisante du mouton. Comme l'expliquent Nathanson N. et al. (Rev. Infect. Dis. 1985 ; 7, 75-82), Hoffman P.M. et Panitch H.S. ("Handbook of Clinical Neurology, 12 ; Viral diseases" R.R. Mc Kendall, ed., Elsevier science 20 Publishing, Amsterdam, 1989, 453-466) et A. Haase (Nature 1986 ; 322, 130-136), elle diffère quelque peu de l'infection naturelle, mais reste néanmoins proche de la SEP. Il est par ailleurs intéressant de noter que dans 25 l'ensemble des travaux effectués sur ce sujet par les auteurs précités, le virus Visna est régulièrement retrouvé dans les cellules de plexus choroïdes du cerveau 30 35

des moutons infectés qui constituent un site de latence et de réPLICATION occasionnelle du provirus Visna ; la localisation de ces cellules à l'interface sang/liquide céphalo-rachidien expliquant certainement ce phénomène.

5 Tous ces résultats plaident en faveur du rôle dans la SEP d'un rétrovirus inconnu.

Récemment, les travaux de H. PERRON et al. (Res. Virol. 1989 ; 140, 551-561 dans "Current concepts in multiple sclerosis" Wiethölter et al., eds. Amsterdam, 10 Elsevier, 1991, p. 111-116 et The Lancet 1991 ; 337, 862-863) ont permis, à partir d'une ponction lombaire de liquide céphalo-rachidien d'un patient souffrant de SEP d'isoler une lignée de cellules non lymphoïdes et de mettre en évidence la présence d'un virus, présentant les 15 caractéristiques d'un rétrovirus montrant en particulier une activité transcriptase inverse, dans les cellules de cette lignée. L'étude au microscope électronique des cellules de cette lignée a permis de mettre en évidence des particules virales d'un diamètre compris environ entre 20 110 et 140 nm, la taille des particules est variable selon qu'il s'agit de particules matures ou immatures. Par ailleurs, une étude sérologique, selon la technique ELISA, utilisant un extrait cellulaire des cellules infectées de cette lignée, a permis de montrer, avec 40 sérums de 25 patients parmi lesquels 20 sont atteints de SEP et 20 sont des malades présumés, 60 % de résultats positifs. Une étude comparative avec 40 sérums de patients atteints d'autres maladies neurologiques que la SEP n'a donné que 5 % de résultats positifs. Cette lignée, que les auteurs ont 30 dénommée LM7, est clonale et non-immortelle et son étude immunocytochimique et ultrastructurale a permis de caractériser son origine leptoméningée.

Ce virus s'est avéré cependant très difficile à étudier, du fait que d'une part il s'exprime très 35 faiblement, in vitro, dans la lignée cellulaire primaire d'origine leptoméningée, et que d'autre part cette lignée

cellulaire dégénère assez rapidement après une trentaine de passages par extinction de son pouvoir mitotique, de sorte qu'elle ne permet plus l'expression virale.

Aussi, les auteurs ont envisagé une nouvelle approche (H. Perron et al., The Lancet, vol. 337, 862-863, 5 (1991)), qui consiste à prélever un échantillon sanguin chez un patient atteint de SEP, à effectuer une culture de monocytes et à recueillir le surnageant pour vérifier l'expression d'une activité transcriptase inverse. Les 10 culots de centrifugation contenant des débris cellulaires et potentiellement des particules virales ont ensuite été cultivés sur des cellules du sang de cordon, pour la mise en évidence d'une expression virale. Une étude au microscope électronique des cellules infectées a permis de 15 mettre en évidence des particules semblables à des rétrovirus de 100 à 120 nm qui sont régulièrement retrouvés dans les culots de culture exprimant une activité transcriptase inverse. Cependant, comme expliqué par les auteurs, l'effet cytopathique dans les cellules de 20 sang de cordon infecté n'est plus détectable six semaines après l'inoculation, de sorte que ce mode de culture n'est pas satisfaisant pour une étude approfondie des caractéristiques de ce virus.

Il est donc indispensable de disposer d'un procédé 25 pour la culture *in vitro* de cellules primaires infectées par un virus associé à la sclérose en plaques, un tel procédé n'étant pas disponible à ce jour.

La présente invention procède de la découverte 30 surprenante d'un procédé permettant la culture *in vitro* de cellules primaires infectées par un virus associé à la SEP et l'obtention de lignées cellulaires infectées assurant une bonne réPLICATION et expression du virus.

Selon l'invention, le procédé consiste à effectuer 35 une culture de cellules permissives au virus, ces cellules étant choisies parmi les cellules de plexus choroïdes humains non infectées et des cellules de Schwannome

humains non infectées, dans un milieu de culture approprié, comprenant au moins les constituants nécessaires à la croissance desdites cellules permissives et un anticorps polyclonal anti-interféron bêta ; puis à 5 mettre en contact lesdites cellules ainsi cultivées avec des cellules primaires infectées par le virus dans des conditions déterminées permettant la propagation du virus des cellules primaires infectées aux cellules cultivées, sa réPLICATION et son expression.

10 Selon un mode de réalisation de l'invention, le milieu comprend de plus un facteur de croissance, avantageusement le facteur de croissance de l'épiderme (EGF).

15 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, les cellules cultivées et les cellules primaires infectées sont maintenues en contact pendant 5 à 8 jours.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, les cellules primaires infectées, avant mise en contact avec les cellules permissives cultivées sont 20 préalablement traitées par irradiation, par exemple par irradiation par des rayons X.

L'invention a aussi pour objet les lignées cellulaires de plexus choroïdes humains et les lignées cellulaires de Schwannome humains infectées par un virus 25 associé à la SEP.

L'invention a encore pour objet l'utilisation de cellules de plexus choroïdes et de cellules de Schwannome infectées par un virus associé à la SEP pour la détection d'anticorps dans un fluide biologique.

30 L'invention a enfin pour objet l'utilisation desdites cellules infectées pour la mise au point d'une préparation vaccinale.

35 L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description détaillée qui va suivre faite en référence aux figures annexées dans lesquelles :

La figure 1, représente la cinétique de l'activité transcriptase inverse détectée dans le surnageant d'une culture de cellules de plexus choroïdes humains infectés par co-culture avec des cellules primaires leptoméningées dites LM711PC, et comparaison avec l'activité transcriptase inverse détectée dans des cellules de plexus choroïdes humains primaires infectées, dites PC, prélevées post-mortem chez un patient et n'ayant pas été co-cultivées ; en ordonnées est représentée l'activité transcriptase inverse, en nombre de désintégrations par minutes, pour 10^6 cellules, et en abscisses est représenté le nombre de passages après co-culture.

La figure 2, représente la cinétique de l'activité transcriptase inverse détectée dans le surnageant d'une culture de cellules de Schwannome humains infectées par co-culture avec des cellules primaires leptoméningées ou avec des cellules de plexus choroïdes humains primaires, dites GICAN 711, GICAN 711P, et comparaison avec la cinétique de l'activité transcriptase inverse détectée dans des cellules de Schwannome n'ayant pas été co-cultivées, dites GICAN ; en ordonnées est représenté le nombre de désintégrations par minutes, pour 10 ml de surnageant, et en abscisses est représenté le nombre de semaines après co-culture.

La figure 3, représente l'activité transcriptase inverse de particules sédimentant à une densité connue pour les rétrovirus ; en ordonnées est représenté le nombre de désintégrations par minutes, et en abscisses est représentée la fraction par son numéro.

30

Exemple 1 : Préparation in vitro d'une culture primaire de cellules infectées par un virus associé à la sclérose en plaques.

Le terme culture primaire, tel qu'utilisé dans la présentation invention, fait référence à une culture de cellules directement dérivées de cellules ou de tissus

prélevés in vivo chez un individu, ainsi qu'aux cellules dérivées par passage de ces cellules. Les cellules prélevées in vivo peuvent être toutes cellules infectées par le virus, par exemple des cellules leptoméningées isolées du fluide cérébrospinal d'un patient (H. Perron et al., Res. Biol., 140, 551-561 (1989)), des monocytes (H. Perron et al., The Lancet, vol. 337, 862-863, 10 avril 1991), des lymphocytes (S.A. Haahr et al., The Lancet, vol. 337, 863-864, 6 avril 1991) ou analogues. Les méthodes pour préparer des cultures primaires à partir de ces cellules et les conditions pour leur croissance in vitro sont connues de l'homme du métier (voir références ci-dessus). Un autre candidat pour la préparation d'une culture primaire est représenté par les cellules plexus choroïdes humains, qui sont présumées être un site de latence pour un virus associé à la sclérose en plaques, par analogie aux observations faites sur le mouton infecté par le rétrovirus Visna, qui provoque chez cet animal une maladie proche de la SEP. Les cellules de plexus choroïdes sont mises en culture selon les techniques classiques, après explantation de plexus choroïdes humains obtenus post mortem.

Exemple 2 : Préparation d'une culture de cellules permisives à un virus associé à la SEP.

a) culture de cellules de plexus choroïdes

Des cellules de plexus choroïdes non infectées obtenues après explantation post mortem de plexus choroïdes humains sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 comprenant : de la penicilline (200.000 U/l), de la streptomycine (200mg/l), de la L-glutamine (6 mM/l), du pyruvate 1%, du sérum de veau foetal 1% complémenté par incubation à 56°C pendant 30 mn et un anticorps polyclonal anti-interféron bêta humain (BOEHRINGER, ref. 853-607: 10 à 50U/ml, de préférence 10U/ml). De préférence, le milieu de culture comprend de plus un facteur de croissance tel

que le facteur de croissance de l'épiderme (ECGF) associé à de l'héparine (BOEHRINGER ref. 1/79/87 : ECGF 10-20ng/ml, héparine 50-150 μ g/ml). L'anticorps polyclonal anti-interféron bêta humain est ajouté au milieu de culture comme inhibiteur de l'interféron bêta humain produit par les cellules humaines qui limite la prolifération des virus. L'utilisation d'anticorps anti-interféron bêta permet d'augmenter l'expression du virus dans les cellules de plexus choroides après co-culture comme décrit ci-après.

b) culture des cellules de Schwannome.

Les cellules de Schwannome non infectées sont des cellules tumorales induites par un cancer de la gaine de Schwann et constituent donc une lignée cellulaire immortelle. Des cellules de Schwannome sont mises en culture dans des conditions identiques à celles décrites ci-dessus en présence d'anticorps polyclonal anti-interféron bêta qui permet de maintenir une infection chronique des cellules de Schwannome après co-culture comme décrit ci-après. Les cultures des cellules de Schwannome ne requièrent cependant pas l'addition d'un facteur de croissance.

Exemple 3 : Coculture d'une lignée cellulaire primaire infectée par une virus associé à la SEP et de cellules permissives au virus.

Des cellules d'une culture primaire infectées, comme décrit dans l'exemple 1 par un virus associé à la SEP, par exemple le virus LM7, sont dissociées de leur milieu de culture primaire, les cellules proliférantes ayant adhérées au fond du tube, puis reprises dans un milieu de culture approprié à la coculture, c'est-à-dire soit le milieu de culture des cellules de plexus choroides, soit celui des cellules de Schwannome comme décrit dans l'exemple 2. Parallèlement, les cellules de plexus choroides ou de Schwannome humain non infectées

sont dissociées respectivement de leur milieu de culture décrits dans l'exemple 2) dans une solution de trypsine-EDTA pour les cellules de plexus choroïdes ou d'EDTA seul pour les cellules de Schwannome. Les cellules sont ensuite 5 centrifugées et resuspendues dans leurs milieux de culture respectifs et sont rajoutées au flacon de la culture primaire cellulaire infectée. Le flacon est placé dans une étuve à CO₂ et on laisse les cellules de plexus choroïdes ou de Schwannome adhérer et proliférer au fond du flacon 10 pendant 24 H. Le milieu est changé après 24 H et le mélange de cellules adhérentes est laissé dans l'étuve à CO₂ jusqu'à ce que la prolifération cellulaire produise une couche confluente, c'est-à-dire un tapis de cellules adhérentes. A ce stade, les cellules sont maintenues 15 encore 5 à 7 jours pour assurer le transfert du virus des cellules primaires infectées aux cellules de Schwannome ou de plexus choroïdes, sa prolifération et sa réPLICATION. La culture cellulaire est ensuite dédoublée et passée dans deux nouveaux flacons qui sont réensemencés avec les 20 cellules de plexus choroïdes ou de Schwannome dissociées en suspension et soumises aux mêmes conditions que décrites ci-dessus pour l'adhésion et la prolifération des cellules, le transfert, l'expression et la réPLICATION du virus. Les cultures de cellules sont ensuite dédoublées 25 régulièrement et passées aussi longtemps que le potentiel mitotique des cellules permissives le permet. Ces cellules qui hébergent et produisent un virus du type LM7 peuvent à leur tour être utilisées pour infecter de nouvelles cellules par coculture comme décrit précédemment.

30 Les milieux de culture sont toujours changés au moins deux fois par semaine et toujours le lendemain d'un nouveau passage, c'est-à-dire à chaque nouvel ensemencement d'un flacon avec des cellules dissociées en suspension.

35 Préalablement à la coculture, les cellules hébergeant une souche virale peuvent éventuellement être

irradiées de manière à éviter leur prolifération ultérieure au sein d'une culture nouvellement infectée. L'irradiation peut par exemple être réalisée avec une dose totale de 6.000 rad de rayons X.

5 Le suivi de la transmission d'un virus de type LM7 et du maintien de son expression dans les cellules obtenues après coculture avec des cellules produisant un tel virus, est réalisé par dosage de l'activité transcriptase inverse dans le surnageant des cultures ,
10 qui est régulièrement prélevé pour renouveler le milieu.

Le dosage de l'activité de cette enzyme caractéristique des rétrovirus se fait dans des conditions déterminées par rapport à la nature et aux concentrations des constituants du milieu réactionnel propres aux autres 15 rétrovirus connus. Dans le cas du virus LM7, les conditions de réaction sont telles que décrites par H. Perron et al. (Res. Biol. 1989 ; 840, 551-561).

Les surnagenats de culture sont collectés deux fois par semaine, précentrifugés à 10.000 tpm pendant 30 20 minutes pour éliminer les débris cellulaires, et ensuite ultracentrifugés à 35.000 tpm pendant 2 heures, pour sédimenter les particules rétrovirales. Les culots sont repris (volume final concentré environ dans un tampon Tris/HCl 0,05 M, pH 9,5) et conservés à - 80°C.

25 Exemple 4 : Dosage de l'activité transcriptase inverse pour le suivi de la production de particules virales de type LM7 dans le surnageant des cellules de plexus choroïde et de schwannome nouvellement infectées.

30 Toutes les étapes sont effectuées avec du matériel et des solutions stériles, afin d'éviter toute interférence avec des nucléases ou protéases bactériennes, notamment pendant les phases d'incubation à 37°C.

35 Les culots contenant les particules virales concentrées sont décongelés et homogénéisés : 20 μ l sont prélevés et ajoutés dans un mélange réactionnel

contenant : $5\mu\text{l}$ Tris 0.5 M-DTT 0,04 M pH 8.2/ $5\mu\text{l}$ NaCl 0.1 M/ $5\mu\text{l}$ MgCl₂ 0.3 M/ $23\mu\text{l}$ H₂O bidistillée / $10\mu\text{l}$ NP40 2%/ $2\mu\text{l}$ polyCm-oligodG12-18 (10 U O.D./ml ; Pharmacia) $5\mu\text{l}$ ^{3H-,3H-Guanosine-Tri-Phosphate} (1 mCi/ml ; NEN). Les tubes
 5 en verre contenant les mélanges sont incubés à 37°C pendant 75 min. La réaction est arrêtée en ajoutant $75\mu\text{l}$ d'une solution à +4°C contenant : 12,5 % H₂O saturée avec du phosphate de sodium, 12,5 % H₂O saturée avec du pyrophosphate de sodium et 20 % d'acide Tri-Chloro-Acétique (TCA). Après 30 min. à 1 heure à 4°C, les tubes
 10 sont remplis avec une solution de 5% TCA, vidés et rincés 5 fois avec la solution à 5% de TCA, sur une membrane d'acétate de cellulose (Sartorius ref. 11106 25 N ; diamètre de pore : $0,45\mu$; diamètre de la membrane : 25mm)
 15 à travers laquelle les échantillons sont filtrés dans un collecteur de fractions 1125 (Millipore ; ref. XX2702550). Avant d'être enlevées, les membranes sont rincées encore une fois avec 20 ml de 5% TCA. Les membranes sont alors placées dans des fioles que l'on remplit de liquide scintillant (Ready-Safe, Beckman) et l'activité est mesurée dans un compteur bêta, en cpm (coups par minute) et dpm (désintégrations par minute).

Chaque échantillon est testé en triple et la moyenne des comptes utilisée comme résultat. Si la
 25 différence entre cette moyenne et l'une des mesures excède deux fois l'écart type mesuré sur des valeurs de référence, l'échantillon correspondant est testé à nouveau.

Ainsi, il a été possible de réaliser la cinétique
 30 de production de virions relargués dans le surnageant de cultures de cellules de plexus choroïde humain nouvellement infectées après coculture avec des cellules leptoméningées infectées par le virus LM7 (Figure 1) et cellules de Schwannome (Figure 2).

35 Pour vérifier que l'activité transcriptase inverse est bien associée à des particules de type rétroviral, les

culots de virion concentrés par ultracentrifugation de surnagenats de culture sur coussin de glycérol sont placés sur des gradients de saccharose (15 à 50 % poids/poids) et ultracentrifugés à +4°C pendant 16 H à 100.000g dans un rotor à godets. 10 fractions sont recueillies et 20 μ l sont prélevés dans chaque fraction pour y doser l'activité transcriptase inverse comme décrit ci-dessus. Le pic spécifique d'activité est retrouvé dans la fraction de densité 1,17 g/ml environ (dosage réfractométrique), ce qui correspond à une densité de sédimentation à l'équilibre connue pour les particules rétrovirales (1,16 à 1,18 g/ml). Un exemple de ce dosage sur gradient est présenté dans la Figure 3.

REVENDICATIONS

1 - Procédé de culture *in vitro* de cellules primaires infectées par un virus associé à la sclérose en plaques caractérisé en ce qu'il consiste à effectuer une 5 culture de cellules permissives au virus, lesdites cellules étant choisies parmi les cellules de plexus choroïdes humains non infectées et des cellules de Schwannome humains non infectées, dans un milieu de culture approprié, comprenant au moins les constituants 10 nécessaires à la croissance desdites cellules permissives et un anticorps polyclonal anti-interféron bêta ; puis à mettre en contact lesdites cellules ainsi cultivées avec des cellules primaires infectées par le virus dans des conditions déterminées permettant la propagation du virus 15 des cellules primaires infectées aux cellules cultivées, sa réplication et son expression.

2 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le milieu comprend de plus un facteur de croissance, tel que le facteur de croissance de 20 l'épiderme.

3 - Procédé selon les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que les cellules primaires infectées sont préalablement traitées par irradiation, par exemple par irradiation aux rayons X, avant mise en contact avec 25 les cellules permissives cultivées.

4 - Lignée cellulaire de plexus choroïde humain infectée par un virus associé à la sclérose en plaques.

5 - Lignée cellulaire de cellules de Schwannome infectées par un virus associé à la sclérose en plaques.

30 6 - Procédé pour la détection d'anticorps dans un fluide biologique caractérisé en ce qu'il consiste, à partir d'un extrait cellulaire de lignées selon les revendications 4 et 5, à mettre en évidence une réaction immunologique.

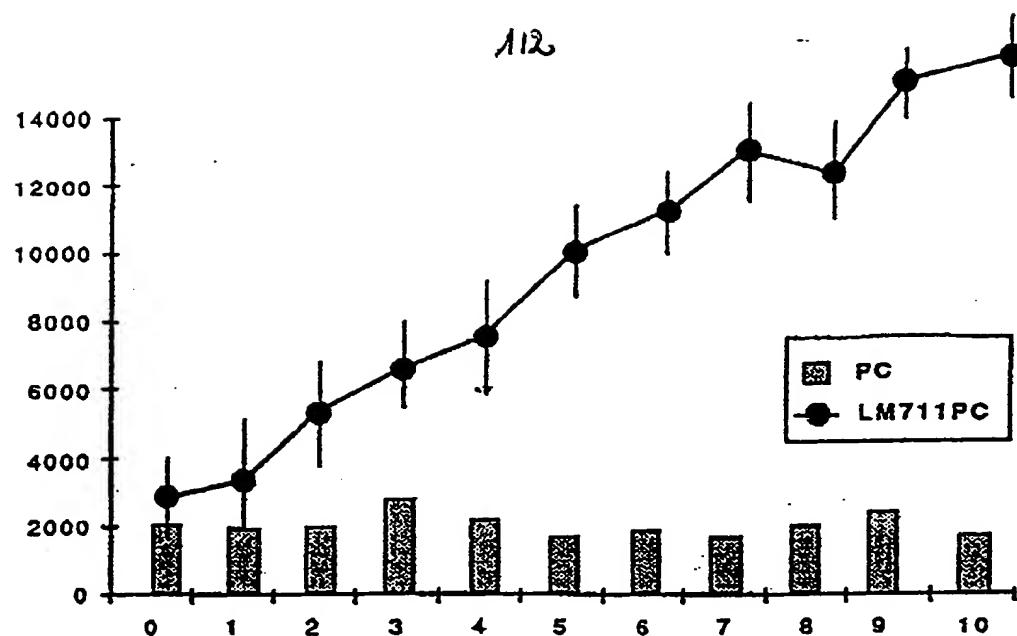


FIG 1.

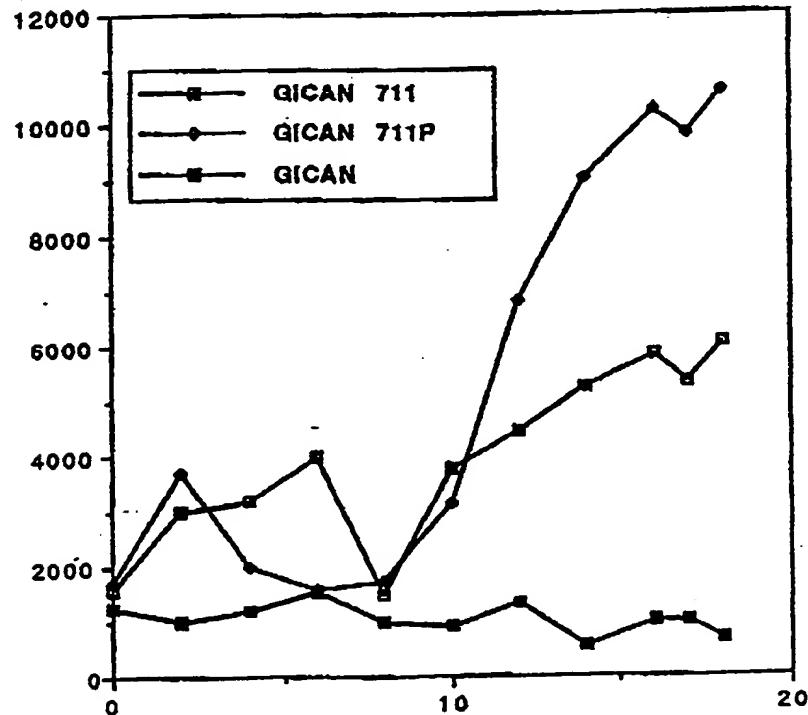


FIG 2

212

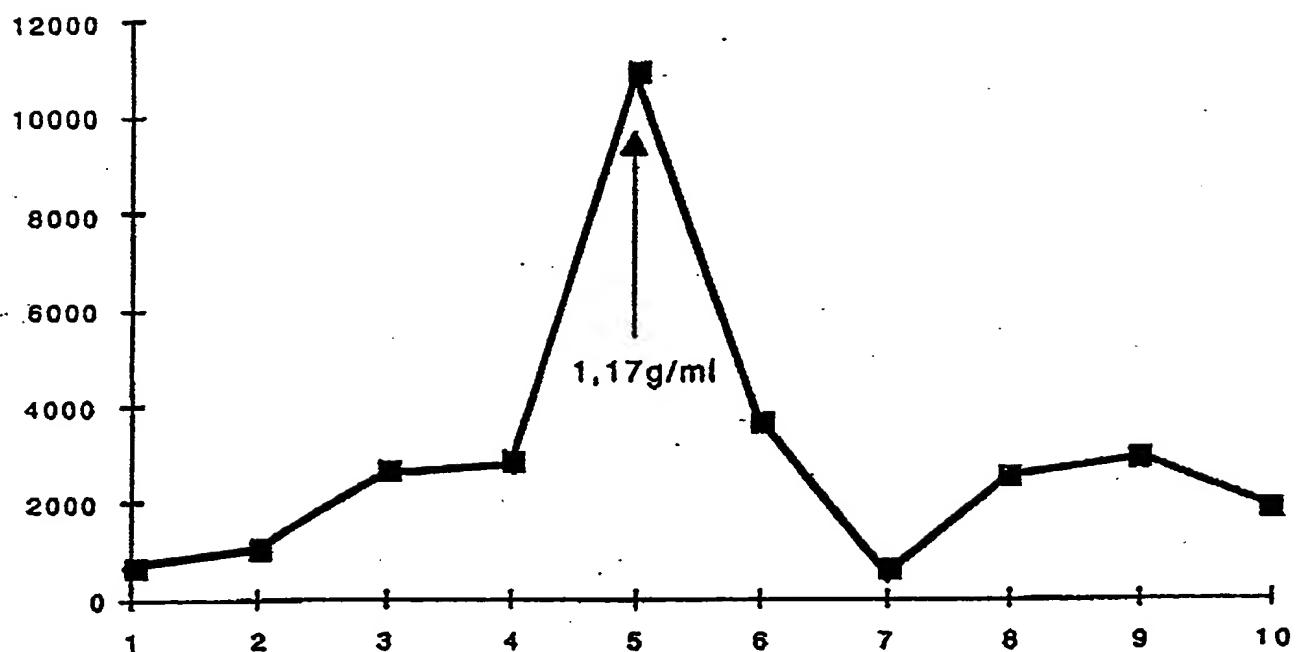


FIG 3